

На правах рукописи

ВАЛЕЕВА ЛИЯ РАШИТОВНА

**ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* С
ГЕНОМ ФИТАЗЫ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПОД
КОНТРОЛЕМ ВИРУСНОГО ПРОМОТОРА**

03.02.03 – Микробиология

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2017

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и в рамках Open Lab «Микробные биотехнологии».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор

Шарипова Маргарита Рашидовна

Научный консультант: кандидат биологических наук, ведущий научный

сотрудник **Шакиров Евгений Витальевич**

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии и молекулярно-генетического анализа ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»
Фаизов Тагир Хадиевич

кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации **Кипенская Лариса Викторовна**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа.

Защита диссертации состоится «27» апреля 2017 г. в ____ ч на заседании диссертационного совета Д.212.081.36 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Карла Маркса, 74, аудитория 205.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук, профессор



З. И. Абрамова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В жизнедеятельности организмов важную роль играют минеральные элементы, дефицит которых может привести к необратимым последствиям. Жизненноважным элементом для клетки является фосфор. Он выполняет структурную и регуляторную функции, включаясь в молекулы нуклеиновых кислот, липидов мембран, АТФ, а также внутриклеточной сигнальной системы. Уровень фосфора поддерживается транспортом ионов из окружающей среды. Микроорганизмы и растения получают ионы фосфора из различных источников, для растений поступление фосфора обеспечивается корневым питанием. Основопологающим фактором в обеспечении растений фосфором является достаточное содержание его легкоусвояемых форм в окружающей среде. В настоящее время сокращение запасов природного неорганического фосфата в форме природных апатитов и фосфоритов является серьезной проблемой для сельского хозяйства [Plaxton, Tran, 2011]. Фосфор накапливается в почве в виде труднорастворимых инозитолфосфатов (фитатов). Входящие в состав фитата фосфатные остатки не усваиваются корнями растений [Belgaroui *et al.*, 2015, 2016]. Таким образом, фитат является лимитирующим фактором роста и развития растений. Кроме того, фитат проявляет и другие антиалиментарные свойства, связывая многие ионы металлов (кальций, цинк, магний, железо), неорганические и органические анионы (нитрат, малат, сульфат), также молекулы белков и сахаров. Хелатированные фитаты, устойчивые к биодegradации, недоступны для большинства живых организмов. Поскольку фитат в больших количествах содержится в почве и в семенах растений, его негативное действие отражается на жизнедеятельности растений и животных.

Кроме отрицательного влияния на питание живых организмов, фитат имеет пагубное воздействие на окружающую среду. Из остатков растительных тканей и неусвоенный животными фитат попадает в почву, вымывается в водоемы и накапливается, что ведет к неконтролируемому росту цианобактерий, водорослей и дальнейшей эвтрофикации, проявляющейся в заболачивании водоемов, дефиците кислорода и гибели водной флоры и фауны [Joshi, Satyanarayana, 2015].

Широкая распространенность фитата в окружающей среде представляет научный и практический интерес в качестве перспективного альтернативного источника фосфора. Это связано с уникальным действием специфических фосфогидролаз – фитаз, которые синтезируются многими почвенными микроорганизмами. Использование фитаз бактерий и микровицетов является эффективным способом утилизации фитата и

повышения доступности фосфата почв. На этой основе развиваются новые биотехнологии, связанные с использованием ферментов микроорганизмов для утилизации труднодоступных фитатов почв и производства кормов для животных.

Цель работы – создание эффективной системы экспрессии бактериальной фитазы *Pantoea agglomerans* под управлением конститутивного вирусного промотора в растениях.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Создать гетерологичную систему экспрессии фитазы *P. agglomerans* для трансформации растений.
2. Получить растения *A. thaliana*, гомозиготные по интегрированному гену бактериальной фитазы *P. agglomerans*.
3. Установить экспрессию гена бактериальной фитазы *P. agglomerans* в растениях.
4. Определить фитазную активность и локализацию бактериального фермента в тканях растений *A. thaliana*.
5. Изучить влияние экспрессии бактериальной фитазы на рост и развитие растений.
6. Определить содержание фосфора в тканях растений при росте на средах с разными источниками фосфора.

Научная новизна. Впервые разработана эффективная система конститутивной экспрессии бактериальной гистидиновой кислой фитазы *Pantoea agglomerans* для растений *A. thaliana*. Показана способность модифицированных растений экспрессировать активную бактериальную фитазу под контролем конститутивного вирусного промотора во всех тканях. Установлено, что под управлением растительного сигнального пептида экстенсина AtExt бактериальный фермент эффективно экспрессируется в ризосфере корней. Рекомбинантная фитаза, экспрессируемая растениями, не теряет каталитической активности и позволяет растениям расти на среде с фитатом в качестве источника неорганического фосфата, при этом содержание фосфора в тканях растений поддерживается на физиологическом уровне. Установлено, что экспрессия бактериальной фитазы не оказывает негативного влияния на рост и развитие растений.

Практическая значимость работы. Установлено, что синтез бактериальной фитазы способствует усвоению почвенного фитата корнями растений, их росту и развитию в условиях недостатка неорганического фосфата. Новая экспрессионная система может быть использована для преодоления дефицита фосфора в питании растений при их росте в фитатобогатенных почвах, для решения проблемы недоступности фосфора

в кормах растительного происхождения для животных с однокамерным желудком и проблемы эвтрофикации водоемов вследствие выброса недоступного фосфора, содержащегося в растительных остатках.

Положения, выносимые на защиту:

1. Получена гетерологичная система экспрессии на основе гена бактериальной фитазы *P. agglomerans* и конститутивного вирусного промотора.
2. Бактериальная фитаза *P. agglomerans* экспрессирована в клеточной стенке клеток растений *A. thaliana*.
3. Экспрессия бактериальной фитазы позволяет выращивать модифицированные растения на среде с фитатом в качестве единственного источника фосфора, способствует улучшению их роста и развития в условиях дефицита фосфора.
4. **Степень достоверности результатов** исследований подтверждается многократными экспериментами, проведенными с соблюдением методик, имеющих мировые стандарты; анализ результатов проводили на современном высокоточном оборудовании и с использованием методов статистической обработки данных; результаты обсуждались на многочисленных научных конференциях с ведущими специалистами в данной области; результаты опубликованы в зарубежных научных изданиях, рецензируемых ведущими учеными в данной области.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на Международных, Всероссийских и региональных конференциях: V Съезде биохимиков России (Дагомыс, 2016), Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS, 2016), международной конференции «Трансляционная Медицина-2016» (Казань, 2016), Всероссийском научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (Казань, 2016), Молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», РАСН, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (Москва, 2013, 2016), Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии» (Иркутск, 2015), Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012, 2014), Всероссийской школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2012, 2014), Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2013, 2014), Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ

(FEBS) «Биологические механизмы» (Санкт-Петербург, 2013), XIX и XX Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых: «Михаил Ломоносов», (Москва, МГУ, 2012, 2013, 2015), XX Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Казань, 2013), Итоговой научно-образовательной конференции студентов Казанского (Приволжского) федерального университета (Казань 2015, 2016).

Связь с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности «Казанского (Приволжского) федерального университета» среди ведущих мировых научно-исследовательских центров на базе Open Lab «Микробные биотехнологии». Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ №15-04-01645а, РФФИ № 16-08-00583а, Федеральной целевой программы «Научные и научно - педагогические кадры инновационной России» 2009-2013гг. (ГК № ПЗ44, ГК № П406, ГК № ПЗ23, ГК № 815, ГК № 1053, ГК № 14.А18.21.0575), а также за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект №14-83 0211/02.11.10083.001).

Личный вклад автора заключается в разработке основной проблемы исследования, планирования, организации и реализации ее экспериментального решения, интерпретации результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 36 научных работ в том числе 11 статей, 2 тезиса в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК для публикации материалов диссертации, 3 публикации перечня РИНЦ, 1 учебно-методическое пособие.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, заключение и список литературы. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц и 23 рисунка. Библиография содержит 124 наименования статей российских и зарубежных авторов.

Благодарности. Автор выражает признательность научному руководителю д.б.н., профессору Института фундаментальной медицины и биологии М.Р. Шариповой за постановку проблемы и внимательное отношение к работе, научному консультанту в.н.с., Ph.D. Е.В. Шакирову, (Техасский университет в Остине, США) за помощь в освоении новых методов и обсуждение результатов, к.б.н., с.н.с. Н.П.Балабан и к.б.н. Ч. Нямсурэн за поддержку и помощь в работе. Автор выражает искреннюю

благодарность всем сотрудникам кафедры микробиологии и лаборатории «Микробные биотехнологии» за всестороннюю помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1 Штаммы и культуры бактерий

В работе мы использовали культуры штаммов бактерий *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21 pLysS, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Штаммы *E. coli* DH5 α и *E. coli* BL21 pLysS предоставлены из коллекции лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов Казанского федерального университета. Штамм *A. tumefaciens* GV3101 любезно предоставлен Е.В. Шакировым (University of Texas at Austin, Austin, USA).

2 Плазмиды и конструкции экспрессионных систем

В работе использовали плазмиды: pCBK05 – бинарный вектор для экспрессии в клетках агробактерий и *E. coli*, содержащий в области Т-ДНК промотор вируса мозаики цветной капусты CaMV35S (343 п.о.) и ген *bar* устойчивости к селективному гербициду BASTA (глюфосинату аммония), регулируемые растительными промотором и терминатором нопалинсинтазы (Pnos, Tnos) (рисунок 1 А). Вектор использовали в качестве контрольной конструкции для трансформации растений *A. thaliana*. Вектор pCEV04 получен нами на основе вектора pCBK05 и содержал модифицированный ген бактериальной фитазы AtEx::paPhyC::His-Strep-Tag (1326 п.о.) под управлением вирусного промотора (рисунок 1 Б). Вектор pUC57 использовали для субклонирования оптимизированного гена фитазы. Для исследования экспрессии фитазы на уровне трансляции белка использовали экспрессионный вектор pET28b. Амплификацию последовательности гена проводили с использованием специфических праймеров.

3 Трансформация бактерий

Перенос гетерологичных конструкций в штаммы *E. coli* DH5 α и *E. coli* BL21 pLysS проводили методом химической трансформации. Компетентные клетки получали стандартным CaCl₂-методом как описано в работе [Sambrook *et al.*, 2001]. Клетки агробактерий трансформировали электропорацией. Электрокомпетентные клетки *A. tumefaciens* GV3101 получали по стандартному методу [Wise *et al.*, 2006].

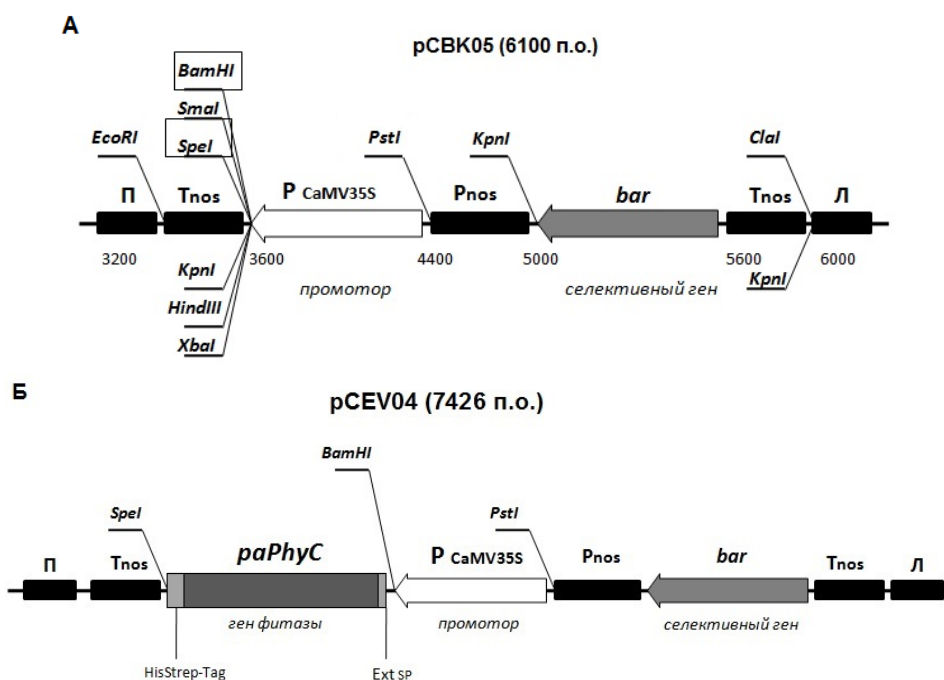


Рисунок 1. Карта Т-ДНК области бинарных векторов для трансформации растений. А. pCBK05 (6100 п.о.) – вектор, содержащий вирусный промотор CaMV35S, без интегрированного гена фитазы. Б. pCEV04 (7426 п.о.) – вектор с интегрированным модифицированным геном фитазы *AtEx::paPhyC::His-Strep-Tag*. P_{CaMV35S} – конститутивный промотор вируса мозаики цветной капусты; *bar* – ген устойчивости к гербициду BASTA; P_{nos}, T_{nos} – промоторная и терминаторная последовательности гена нопалинсинтазы; П, Л – правая и левая фланкирующие последовательности Т-ДНК; *paPhyC* – модифицированный ген фитазы *P.agglomerans*. Линиями обозначены сайты рестрикции EcoRI, BamHI, SmaI, SpeI, SacI, KpnI, HindIII, XbaI, PstI, ClaI. Сайты рестрикции для клонирования гена фитазы выделены прямоугольной рамкой (BamHI, SpeI).

4 Растения *Arabidopsis thaliana*

В работе использовали растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа (экотип Columbia, далее WT). Семена растения предоставлены Е.В. Шакировым (University of Texas at Austin, Austin, USA). Растения выращивали в климатических камерах (Binder; Sanyo) при условиях: фотопериод 16 ч. день/ 8 ч. ночь, 20-22 °С, влажность воздуха 60%. Условия роста растений на почве: семена, предварительно выдержанные 2-3 сут при 4 °С, высаживали в стерильную увлажненную почву.

Выращивание растений в стерильных условиях на чашках Петри. Для селекции и проращивания растений семена высевали стерильно на чашки Петри с использованием среды MS с добавлением гербицида BASTA (25 мкг/мл) и антибиотика ванкомицина (100 мкг/ мл) для угнетения развития контаминантной микрофлоры и выращивали 7-10 дней при стандартных условиях. Перед посевом семена стерилизовали 50% гипохлоридом натрия.

Выращивание растений в гидропонной системе. Эксперименты по росту растений на различных источниках фосфора проводили в гидропонных установках с жидкой минеральной средой с pH 5.5 [Tosquin *et al.*, 2003]. В качестве источника фосфора добавляли 0.8 мМ Na₂HPO₄ или 0.133 мМ фитата натрия (Sigma Aldrich). Семена растений предварительно проращивали на чашках Петри до образования первых настоящих листьев и неразветвленного корня. Далее пересаживали растения в контейнер гидропонной системы и выращивали в течение 35 сут в климатической камере при стандартных условиях.

5 Агробактериальная трансформация растений

Трансформацию растений *A. thaliana* проводили методом агробактериальной трансформации путем макания цветков и бутонов растений в суспензию агробактерий («floral-dip» метод) [Clough, Bent, 1998].

6 Выделение геномной ДНК растений

Выделение геномной ДНК растений проводили по стандартной методике с использованием буфера СТАВ (2% СТАВ (гексадецилметиламмонийбромид), 100 мМ Трис-HCl, 20 мМ EDTA, 1.4 М NaCl, 0.2% β-меркаптоэтанол).

7 Выделение тотальной РНК растений

Выделение тотальной РНК растений проводили по стандартной методике с использованием буферов для разрушения растительных клеточных стенок (Cell lysis buffer, CLB) и осаждения ДНК-белковых комплексов (Protein DNA precipitation buffer, PPB).

8 Получение кДНК

Комплементарную ДНК получали методом обратной транскрипции с использованием набора для получения кДНК «RevertAid (H-) FirstStrand» по стандартной методике (Fermentas). В качестве праймера использовали последовательность OligodT.

9 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для генотипирования линий трансгенных растений и подтверждения экспрессии гена микробной фитазы в тканях трансгенных растений на уровне транскрипции проводили ПЦР с использованием специфических праймеров. ПЦР программа для амплификации: 94 °C – 4 мин; 40 циклов (94 °C – 30 сек., 56.5 °C – 30 сек., 72 °C – 60 сек); 72 °C – 10 мин; 4 °C – хранение.

10 Электрофорез ДНК

Электрофорез ДНК проводили в горизонтальном 1%-ом агарозном геле в камерах для электрофореза (Bio-Rad). Гель просматривали и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе (Molecular Imager Gel DOC, Bio-Rad).

11 Выделение белкового экстракта из тканей растений

Для получения белкового экстракта тканей растений растительную ткань растирали в жидком азоте в ступке до порошкообразного состояния. Белковые экстракты растворимой фракции и фракции, связанной с клеточной стенкой клеток растений получали методом, описанным в работах [George *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2001]. Концентрацию белка в пробах измеряли с помощью набора реактивов DC Protein Assay (Bio-Rad). Измерение проводили на спектрофотометре при длине волны 750 нм.

12 Электрофорез в ПААГ

Разделение белков по молекулярной массе проводили в денатурирующих условиях в присутствии SDS в 12.5%-ном ПААГ по методу Лаэммли [Laemmli, 1970].

13 Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг проводили с использованием первичных антител бх-His Epitope Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8) (Thermo Scientific) к последовательности His-tag в разведении 1:3000 и вторичных антител Pierce Goat Anti-Mouse IgG, (H+L) Peroxidase conjugated (Thermo Scientific) в разведении 1:10000 по стандартной методике. В качестве субстрата для проявления мембраны и детекции флуоресценции использовали растворы Super Signal West Pico Stable Peroxidase Solution и Super Signal West Pico Luminol/ Enhancer Solution (Thermo Scientific).

14 Определение фитазной активности

Активность фитазы определяли по расщеплению фитата под действием белковых экстрактов растений. Фитазную активность рассчитывали по количеству высвобожденного неорганического фосфата при расщеплении молекул фитата под действием фитазы. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мМ субстрата за 1 мин. Измерение высвободившегося неорганического фосфата проводили с помощью колориметрической реакции с образованием молибденовой сини [Jog *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2012].

15 Характеристика растений при росте на средах с разными источниками фосфора

Морфология растений. Способность растений расти на средах с разными источниками фосфора анализировали путем измерения морфологических параметров растений. Измерения параметров (диаметра листовой розетки, общей площади листьев розетки, длины корней) проводили в программе ImageJ.

Измерение сухого веса растений. Для измерения сухого веса образцы корней и побегов растений высушивали в фольге при 70 °С в течение 48 ч в

сухожаровом шкафу. Высушенные образцы взвешивали на аналитических весах с точностью до 0.0001 знака.

Определение содержания фосфора в тканях растений. Содержание фосфора в тканях растений определяли в озоленных образцах колориметрическим методом по протоколу ГОСТ 26657-97 и методом образования молибденовой сини [Jog *et al.*, 2005]. Высушенные образцы побегов и корней растений сжигали в муфельной печи при 400 °С в течение 4 ч.

16 Геноинформатика

Секвенирование ДНК осуществляли в компании «Литех» (Москва) и Протеомном центре ИФМиБ Казанского федерального университета. Результаты секвенирования обрабатывали с помощью алгоритмов программы BLAST: пакета программ, представленных на сервере NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

17 Статистическая и компьютерная обработка данных

Статистический анализ данных, а также их визуализацию проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2008 и программного приложения GraphPad Software (www.graphpad.com). Статистическую значимость рассчитывали с использованием коэффициента Стьюдента и 95% стандартных отклонений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1 Получение гетерологичной системы экспрессии гена бактериальной фитазы *Pantoea agglomerans* в *Arabidopsis thaliana*

1.1 Создание гетерологичного вектора экспрессии гена бактериальной фитазы

Для эффективной экспрессии рекомбинантных белков проводят оптимизацию гетерологичной конструкции, важным этапом которой является оптимизация кодонов. Несоответствия в кодонах в генах разных организмов могут приводить к метаболическому стрессу и нарушениям в процессе трансляции белков в клетке-хозяине [Angov *et al.*, 2011]. Замены нуклеотидов в триплетах в связи с их вырожденностью позволяют адаптировать прокариотический ген для транскрипции и трансляции в клетках эукариот [Ressayre *et al.*, 2015].

Для трансформации растений *A. thaliana* мы получили гетерологичный вектор экспрессии бактериального гена гистидиновой кислой фитазы *P. agglomerans* (GenBank, DQ435815.1) под управлением конститутивного вирусного промотора CaMV35S. Для эффективной экспрессии в клетках

растений провели оптимизацию кодонов в последовательности бактериального гена с помощью программы Codon Adaptation Tool (<http://www.jcat.de/>), что позволило избежать абортивных считываний и отсутствия трансляции вследствие неспецифического и несовпадающего набора тРНК в клетках организма-реципиента. Модификация нуклеотидных остатков в кодонах позволила адаптировать последовательность гена бактериальной фитазы для транскрипции и трансляции в клетках растений *A. thaliana*. Индекс адаптации кодонов (CAI) до оптимизации последовательности составлял 0.32, после оптимизации приблизился к единице (0.92) (максимальное значение индекса при оптимизации CAI=1). В результате изменился Г+Ц состав бактериального гена *paPhyC* с 55.1 % до 35.3 % , что близко к значениям, характерным для генов растений *A. thaliana*. Сравнение первичной структуры белков, транслируемых с нативной и оптимизированной нуклеотидных последовательностей, показало их полную идентичность.

Стратегия клонирования гена бактериальной фитазы включала использование растительного сигнального пептида для выхода рекомбинантного белка из клетки и его взаимодействия с субстратом – фитатом. Для этого бактериальный ген состыковывали на 5'-конце с сигнальной последовательностью растительного гена экстенсина AtExt, а на 3'-конце – с His- и Strep-Tag последовательностями и конструкцию интегрировали в состав Т-ДНК области бинарного вектора под общий с геном устойчивости к гербициду BASTA контроль растительных регуляторных последовательностей – промотора и терминатора нопалин-синтазы. Далее проводили субклонирование последовательности AtExt::*paPhyC*::HisStrep-Tag в Т-ДНК область бинарного вектора pCBK05 под управление вирусного промотора CaMV35S (рекомбинантный вектор с модифицированной фитазой – pCEV04) (рисунок 2 А, Б).

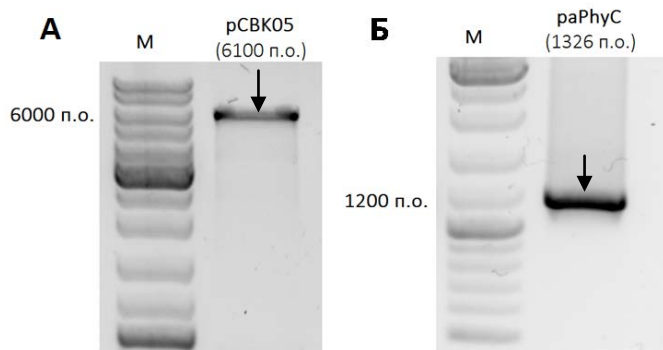


Рисунок 2. Клонирование модифицированного гена фитазы в бинарный вектор pCBK05. А. Электрофорез выделенной плазмиды pCBK05, размер 6100 п.о. Б. Электрофорез амплифицированной последовательности модифицированного гена фитазы AtExt::*paPhyC*::HisStrep-Tag, размер 1326 п.о.

Таким образом, мы получили рекомбинантный вектор pCEV04, содержащий модифицированный ген микробной фитазы под управлением сильного конститутивного вирусного промотора CaMV35S. Особенностью вектора является растительная сигнальная последовательность, обеспечивающая секрецию целевого белка из клеток и сильный промотор, обуславливающий высокий уровень его экспрессии.

Гетерологичный вектор с геном микробной фитазы pCEV04 клонировали в клетки штамма *E. coli* DH5 α (рисунок 3). В качестве контрольной конструкции для изучения влияния трансформации на жизнедеятельность растений использовали вектор pCBK05, не содержащий гена фитазы. Этот вектор трансформировали в штамм *E. coli* DH5 α .

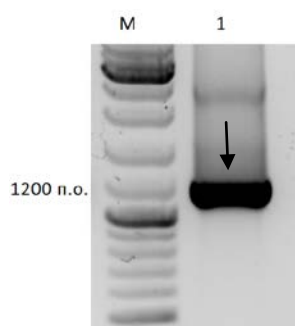


Рисунок 3. Электрофорез амплифицированного участка модифицированного гена фитазы *paPhyC* после клонирования в бинарный вектор pCBK05 и получения рекомбинантного штамма *E. coli* DH5 α . Размер ожидаемого продукта амплификации – около 1200 п.о.

Для изучения экспрессии бактериальной фитазы на уровне трансляции провели клонирование кодон-оптимизированного гена фитазы в вектор pET28b и трансформацию в экспрессионный штамм *E. coli* BL21 pLysS. Последовательность кодон-оптимизированного гена *paPhyC* амплифицировали с использованием специфических праймеров, содержащих в составе последовательности сайтов рестрикции NcoI и XhoI. Полученный фрагмент клонировали в экспрессионный вектор pET28b и трансформировали в клетки штамма *E. coli* DH5 α . Далее провели субклонирование вектора в экспрессионный штамм *E. coli* BL21 pLysS. Результаты клонирования анализировали методами ПЦР-анализа и секвенирования (рисунок 4).

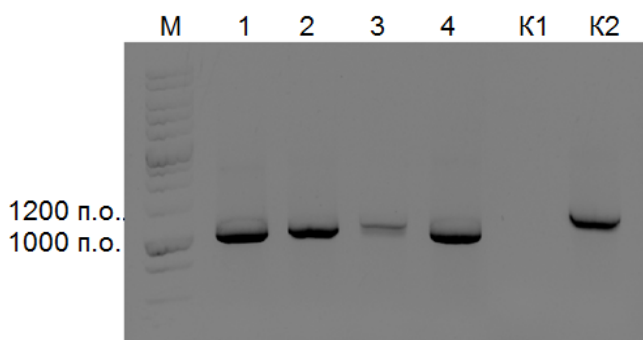


Рисунок 4 – Электрофорез после ПЦР с колоний *E. coli* BL 21 pLysS. М – молекулярный маркер (М 12); 1-4 – образцы по порядку; K1 – отрицательный контроль (плазмида pET28b); K2 – положительный контроль (плазмида pET 28b *paPhyC*).

Таким образом, получили рекомбинантный экспрессионный вектор с геном оптимизированной бактериальной фитазы *P. agglomerans paPhyC*, интегрированной под управлением T7-промотора.

1.2 Получение рекомбинантного штамма *Agrobacterium tumefaciens* с интегрированным геном бактериальной фитазы

Рекомбинантный вектор pCEV04 с модифицированной последовательностью гена фитазы AtEx::*paPhyC*::HisStrep-tag под контролем промотора CaMV35S субклонировали в штамм агробактерий *A. tumefaciens* GV3101 методом электропорации. Трансформацию проводили с использованием электрокомпетентных клеток штамма *A. tumefaciens* GV3101. Также получали рекомбинантный штамм *A. tumefaciens* GV3101 с интегрированным вектором pCBK05 без включения бактериального гена в качестве контрольной конструкции. Таким образом, получили рекомбинантные штаммы агробактерий *A. tumefaciens* GV3101, несущих бинарные векторы pCEV04 и pCBK05 с геном фитазы и без него, соответственно, для трансформации растений *A. thaliana*.

1.3 Агробактериальная трансформация *A. thaliana*

Растения *A. thaliana* с интегрированным модифицированным геном фитазы *paPhyC*, а также контрольную линию модифицированных растений с плазмидой pCBK05 без гена фитазы получали путем агробактериальной трансформации с использованием полученных нами рекомбинантных штаммов *A. tumefaciens* GV3101 и GV3101 *paPhyC*, модифицированных плазмидами pCBK05 и pCEV04, соответственно.

От первичных трансформантов растений T0 поколения, обработанных рекомбинантными агробактериями, получали семена. Семена высевали на чашки Петри с селективной средой с добавлением гербицида и проводили отбор трансформантов (рисунок 5).

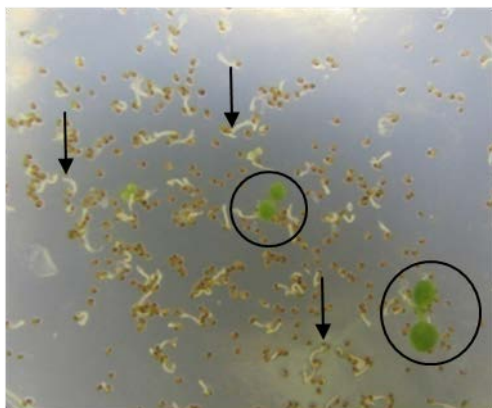


Рисунок 5. Селекция растений-трансформантов T1 на среде с гербицидом BASTA. Растения-трансформанты, несущие вставку T-ДНК с геном устойчивости, отмечены окружностями. Стрелками указаны растения WT, не прошедшие трансформацию.

Модифицированные растения пересаживали на почву для получения следующих поколений и отбора гомозиготных по гену гетерологичной

фитазы растений. С использованием вектора pCEV04, содержащего бактериальный ген фитазы *paPhyC*, получили 3 независимые линии (Е1, Е2, Е3 линии) растений первого поколения Т1 (таблица 1). Наличие трансгенной вставки подтверждали генотипированием (рисунок 6 А).

Во втором поколении (Т2) сегрегация признака трансгенной вставки составила 3:1 у линий растений Е1-6 и Е3-8, что указывало на присутствие единичной вставки гена фитазы в геном растений, и 15:1 у линий растений Е2-7, Е2-16, что свидетельствовало о наличии множественной вставки гена фитазы. В третьем поколении растений (Т3) нами получены гомозиготные линии растений Е1-6-3, Е1-6-8, Е3-8-1, Е3-8-2, Е3-8-4. Гомозиготные растения от линии Е2 получили в пятом поколении (Е2-7-1-4-2, Е2-16-19-6-8), что обусловлено множественной вставкой гена фитазы в геном растения при его трансформации.

Параллельно получили контрольные линии трансгенных растений без встроенного гена фитазы (О1, О11), конструкция содержала только вирусный промотор $P_{CaMV35S}$. В поколении Т2 получили линии с сегрегацией 3:1 (О1-1, О11-7). Гомозиготные линии получили в Т3 поколении (О1-1-5, О1-11-8) (таблица 1). Наличие трансгенной вставки подтвердили ПЦР анализом (рисунок 6 Б).

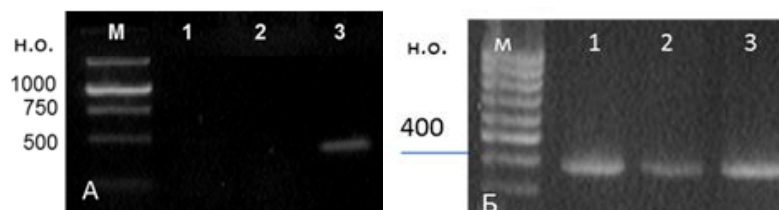


Рисунок 6 – Генотипирование трансгенных растений *A. thaliana*. А – ПЦР для линии растений с интегрированным геном фитазы *P. agglomerans* под управлением промотора $CaMV35S$ (линии Е). Ожидаемый размер ПЦР-продукта с парой праймеров *Pasyn-For* и *paPhyC-mid-Rev* около 500 п.о. М – маркер; 1 – О1-1 (отрицательный контроль); 2 – О1-2 (отрицательный контроль); 3 – линия Е-1. Б – ПЦР для контрольной линии трансгенных растений без гена фитазы (линия О1). Ожидаемый размер ПЦР-продукта с парой праймеров 35S-F и TerNos-R – 400 п.о. М – маркер; 1 – О1-1; 2 – О1-2; 3 – плазмидная ДНК (положительный контроль).

Таким образом, нами получены 3 независимые гомозиготные линии растений *A. thaliana* со встроенным геном бактериальной фитазы и 2 линии растений, модифицированных вектором без гена фитазы.

2 Анализ экспрессии гена бактериальной фитазы в растениях *A. thaliana*

Важным этапом в разработке гетерологичных систем является доказательство экспрессии целевых белков на уровне транскрипции,

поскольку для агробактериальной трансформации характерно случайное встраивание Т-ДНК в геном растений, что может привести к интеграции целевой последовательности в нетранскрибируемую область. Кроме того, во внутриклеточных компартментах эукариот (везикулах эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи) происходит посттрансляционная модификация белка, например, N-гликозилирование [Huang *et al.*, 2015]. В связи с чем, проводили анализ экспрессии бактериального гена в растениях.

2.1 Экспрессия бактериальной фитазы в растениях на транскрипционном и трансляционном уровне

Мы анализировали РНК полученных растений на наличие транскриптов гена бактериальной фитазы. Для анализа выделяли общую РНК растений, для которых генотипирование показало наличие интегрированного гена микробной фитазы, и проводили реакцию обратной транскрипции. С полученной кДНК амплифицировали последовательность бактериального гена *paPhyC*, используя специфические праймеры к началу и концу гена фитазы. В результате получили амплифицированную последовательность длиной около 1300 п.о., что соответствовало длине модифицированного гена фитазы (рисунок 7). Отсутствие мутаций и делеций в экспрессируемых мРНК гена фитазы *paPhyC* установили путем секвенирования последовательности кДНК гена фитазы.

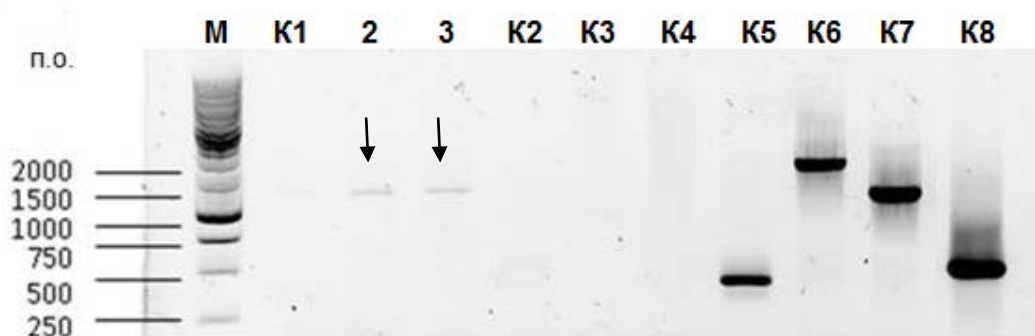


Рисунок 7 – Электрофорез продуктов амплификации кДНК трансгенных растений с интегрированным геном фитазы *P. agglomerans* под управлением вирусного промотора CaMV35S. Для линий растений K1, K7, 2-3 использовали праймеры к гену фитазы (размер ПЦР-продукта около 1300 п.о.); для K2-K4, K6 использовали праймеры к промоторной и терминаторной областям гена (размер 1800 п.о.); для K5 – праймер к промоторной области CaMV35S (размер продукта около 500 п.о.). K1-K4, 2-3 – пробы кДНК (обозначены стрелками); K5-K7 – пробы геномной ДНК. K1 – отрицательный контроль (O1-1-5); 2 – E2-7-5; 3 – E3-4-3; K2 – O1-1-5; K3 – E2-7-5; K4 – E3-4-3; K5 – O1-1-5; K6 – E2-7-5; K7 – E2-7-5; K8 – контроль на реакцию ОТ-ПЦР.

Анализ экспрессии фитазы на уровне трансляции белка проводили методом иммуноблотинга со специфическими антителами к His-Tag

последовательности, входящей в состав рекомбинантной фитазы. Мы показали, что рекомбинантная фитаза в различных фракциях клеток модифицированных растений варьирует по молекулярной массе. В растворимой фракции белка мы обнаружили фитазу с молекулярной массой около 50-55 кДа (рисунок 8 А), что превышало размеры нативной бактериальной фитазы *P. agglomerans* (42 кДа). Тогда как анализ фракции белков, связанных с клеточной стенкой клеток растений, показал наличие белка с молекулярной массой около 40 кДа (рисунок 8 Б). Большая молекулярная масса фитазы из растворимой фракции белка модифицированных растений может быть связана с N-гликозилированием рекомбинантного белка [Drakakaki *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2014]. Чтобы определить молекулярную массу рекомбинантной фитазы *PaPhyC* экспрессия фермента изучена нами в клетках штамма *E. coli* BL21 pLysS. Ее молекулярная масса составила около 45 кДа (рисунок 8 В). В клетках прокариот не происходит N-гликозилирования и продуцируемая в бактериальных клетках фитаза соответствовала по молекулярной массе целевому белку.

Наличие сигнального пептида в составе модифицированной фитазы обуславливало ее транслокацию в везикулы эндоплазматического ретикулума клетки. Имеются данные, что рекомбинантные белки с сигнальным пептидом не всегда проходят по секреторному пути, и часть остается внутри клетки [Huang *et al.*, 2015].

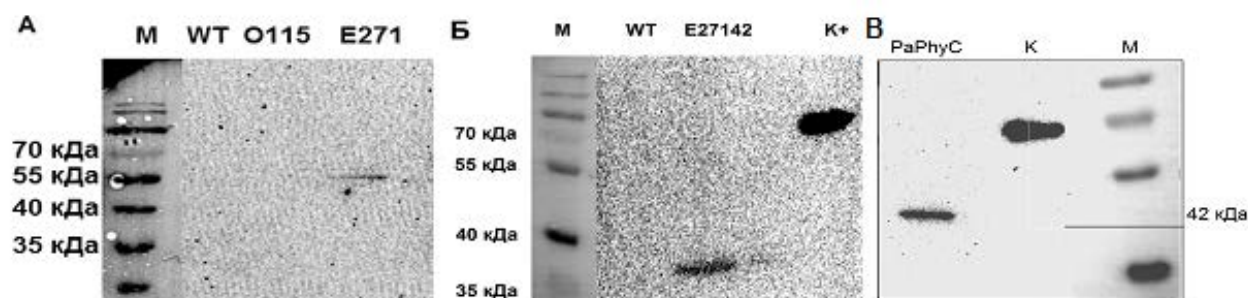


Рисунок 8 – Вестерн-блот анализ экспрессии фитазы *PaPhyC* *P. agglomerans* под управлением вирусного промотора CaMV35S. А. Анализ растворимой белковой фракции побегов растений. Б. Анализ белковых экстрактов клеточной стенки клеток растений. М – молекулярный маркер; 1 – WT (отрицательный контроль); 2 – O1-1-5 (отрицательный контроль); E2-7-1, E2-7-1-4-2 – белковые пробы из модифицированных растений; K⁺ - положительный контроль. В. Western-blot анализ экспрессии фитазы *PaPhyC* *P. agglomerans* рекомбинантным штаммом *E. coli* BL21 pLysS в присутствии индуктора экспрессии IPTG. М – молекулярный маркер; K⁺ - положительный контроль; *PaPhyC* *A. thaliana* – фитаза, экспрессируемая в клетках арабидопсиса, из растворимой фракции белка клеток.

2.2 Активность бактериальной фитазы, экспрессируемой растениями

У полученных растений *A. thaliana*, экспрессирующих бактериальную фитазу, показали повышение фитазной активности по сравнению с растениями дикого типа. Фитазная активность превышала активность у трансгенных растений *B. napus*, *A. thaliana*, а также каталитическую активность фитаз в семенах растений в работах [Belgaroui *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012; Azeke *et al.*, 2011]. В условиях с добавлением неорганического фосфата фитазная активность определена нами в растворимой фракции и фракции клеточной стенки клеток на одинаково высоком уровне по сравнению с растениями дикого типа и составила 2.27 ± 0.82 , 0.40 ± 0.11 и 2.57 ± 0.32 ; и 2.55 ± 0.601 , 1.77 ± 0.33 и 1.24 ± 0.20 Ед/мг белка в линиях E1-6-8, E2-7-1-4-2 и E3-8-2, соответственно в двух фракциях белка (рисунок 19 А, Б, таблица 2). При росте на фитате фитазная активность ассоциирована с фракцией белка клеточной стенки растений, тогда как в растворимой фракции активность была снижена, хотя и превосходила значения у контрольных линий растений. Так, в растворимой фракции у линий E1-6-8, E2-7-1-4-2 и E3-8-2 фитазная активность составила 0.07 ± 0.009 , 0.14 ± 0.05 и 0.11 ± 0.04 ; во фракции клеточной стенки клеток – 1.59 ± 0.60 , 0.20 ± 0.009 и 2.63 ± 0.27 Ед/ мг белка (рисунок 9 А, Б, таблица 1). Во всех вариантах фитазная активность в контрольных линиях составляла от 0.004 до 0.06 Ед/ мг белка у дикого типа растений и от 0.003 до 0.04 Ед/ мг белка у трансгенных растений линии O1-1-5.

Таким образом, по совокупности полученных нами данных, растения, экспрессирующие бактериальную фитазу *PaPhyC* обладали высокой внеклеточной фитазной активностью, что позволило им усваивать фитат из окружающей среды.

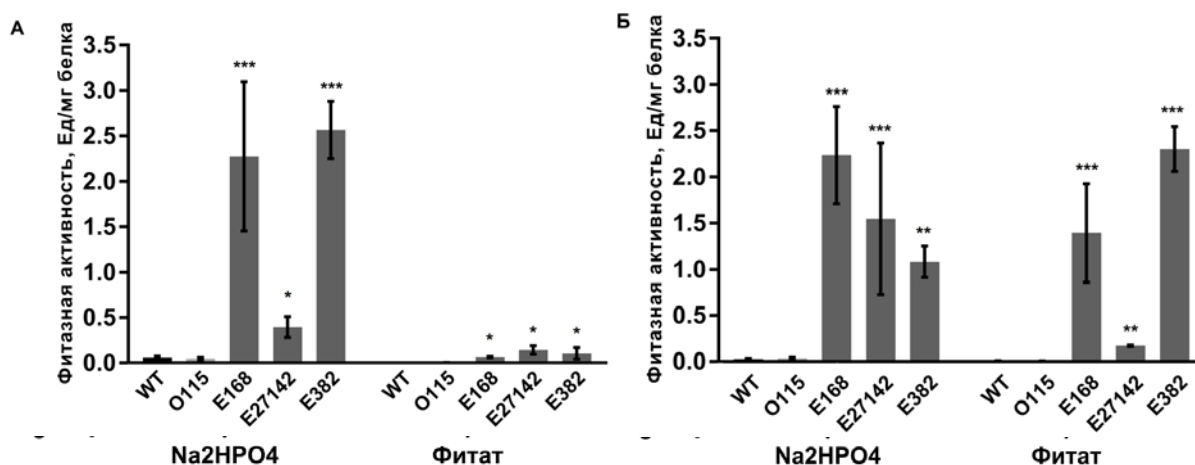


Рисунок 9. Фитазная активность растений дикого типа и модифицированных геном бактериальной фитазы *paPhyC*. А. Растворимая белковая фракция клеток корней растений. Б. Белковая фракция, ассоциированная с клеточной стенкой клеток корней растений. Na₂HPO₄ – неорганический фосфат. WT – дикий тип растений, О-контрольная линия растений, Е- линии модифицированных растений. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (статистическая значимость).

Таблица 1. Фитазная активность (Ед/мг белка) растений *A. thaliana*, экспрессирующих бактериальную фитазу, при росте на среде с неорганическим фосфатом или фитатом.

Линия растений	Источник фосфора – неорганический фосфат		Источник фосфора – фитат	
	Растворимая фракция	Клеточная стенка	Растворимая фракция	Клеточная стенка
E1-6-8	2.27±0.82	2.55±0.60	0.07±0.009	1.59±0.60
E2-7-1-4-2	0.40±0.11	1.77±0.33	0.14±0.05	0.20±0.009
E3-8-2	2.57±0.32	1.24±0.20	0.11±0.04	2.63±0.27
WT (контроль)	0.06±0.01	0.03±0.009	0.004±0.0006	0.007±0.003
O1-1-5 (контроль)	0.05±0.01	0.04±0.01	0.003±0.0004	0.005±0.002

3 Характеристика растений, экспрессирующих модифицированную бактериальную фитазу

Характеристики растений, экспрессирующих бактериальную фитазу, мы оценивали в условиях дефицита фосфора и условиях нормального минерального питания. Для установления способности модифицированных растений использовать фитат как источник фосфора проводили анализ

морфологии полученных растений при росте на среде с фитатом и исследовали жизнеспособность семян и проростков растений.

3.1 Влияние гетерологичной экспрессии на жизнеспособность семян растений

Одним из параметров для характеристики жизнеспособности модифицированных растений является способность к прорастанию семян и выживаемость проростков. Установили, что у растений с геном бактериальной фитазы не снижалась способность к прорастанию семян и нормальному развитию проростков. Семена, собранные с растений дикого типа, и растений, экспрессирующих рекомбинантную фитазу, а также семена контрольной модифицированной линии имели одинаково высокий уровень прорастания: 94.6 – 98.9% проросших и не имеющих дефектов в развитии растений из общего количества посеянных семян.

3.2 Влияние гетерологичной экспрессии на рост и морфологию модифицированных растений

Одним из показателей эффективности экспрессии микробной фитазы в растениях является приобретение ими способности расти на средах с труднодоступным фитатом в качестве единственного источника фосфора. Растения модифицированных линий и дикого типа выращивали на среде с добавлением фитата натрия в качестве единственного источника фосфора, а также на среде с неорганическим фосфатом в качестве контроля нормального роста и развития растений. На 30-35 сут роста проявилось визуальное различие между растениями, экспрессирующими бактериальную фитазу, и растениями дикого типа и контрольной группой модифицированных растений (рисунок 10). Измерение морфологических параметров модифицированных растений при росте на среде с фитатом, показало, что они способны полноценно расти и развиваться так же, как и в условиях достаточного обеспечения неорганическим фосфатом в отличие от растений без интегрированного гена фитазы (таблицы 3, 4). Кроме того, при достаточном уровне фосфора в среде нами не выявлено различий между трансгенными растениями и растениями дикого типа, что указывало на отсутствие негативного влияния модификации на растения.

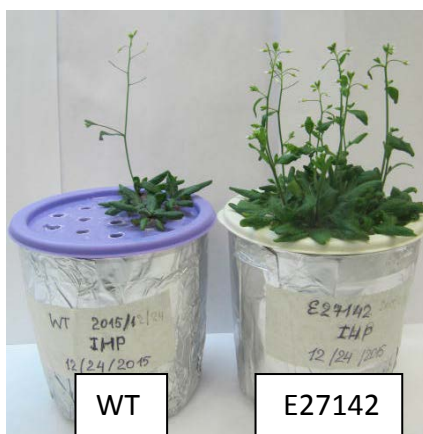


Рисунок 10. Рост модифицированных растений (E2-7-1-4-2) и растений дикого типа (WT) на среде с фитатом в качестве единственного источника фосфора.

Таблица 3. Характеристика растений, экспрессирующих бактериальную фитазу, и растений контрольных линий при росте на средах с фитатом или неорганическим фосфатом в качестве источника фосфора.

Линия/ Исследуемый параметр	Источник фосфора.	WT	O1-1-5	E1-6-8	E2-7-1-4-2	E3-8-2
Сухая масса побегов, мг/растение	Неорг. Ф.	10.40±0.86	9.60±2.45	8.61±2.60	11.16±5.10,	8.54±2.77
	Фитат	4.65±0.32	4.67±2.25	15.20±6.41	19.05±5.25	22.36±8.63
Диаметр розетки, мм	Неорг. Ф.	59.71±7.82	56.45±10.37	65.73±5.91	64.49±15.51	61.71±6.10
	Фитат	24.52±4.95	16.66±3.06	41.94±8.60	47.36±10.50	58.72±1.30
Общая площадь листьев, мм ²	Неорг. Ф.	1428.67±38.0	1342.1±182.71	1530.44±217.3	1553.5±317.6	1250.0±297.6
	Фитат	360.70±20.3	305.40±81.6	1087.77±294.1	1374.4±199.6	1265.0±295.8

Таблица 4. Характеристика корневой системы растений, росших на средах с фитатом или неорганическим фосфатом в качестве источника фосфора.

Линия/ Исследуемый параметр	Источник Ф.	WT	O1-1-5	E1-6-8	E2-7-1-4-2	E3-8-2
Сухая масса корней, мг/растение	Неорг. Ф.	2.67±0.07	2.23±0.14	2.66±0.46	2.22±0.19	2.36±0.77
	Фитат	1.25±0.16	1.55±0.53	2.15±0.98	2.30±0.28	3.87±0.81
Длина главного корня, см	Неорг. Ф.	15.19±3.26	16.19±2.13	15.37±2.41	15.75±0.77	14.60±1.00
	Фитат	16.74±3.01	13.49±0.74	17.41±4.59	17.14±1.51	16.87±3.28
Общая длина латеральных корней, см	Неорг. Ф.	106.72±5.89	119.28±13.9	113.24±31.1	123.22±22.9	107.33±25.7
	Фитат	118.31±4.79	73.10±5.08	163.0±25.24	130.78±20.1	157.43±33.1

3.3 Содержание фосфора в тканях растений при росте на среде с фитатом

Способность растений, экспрессирующих бактериальную фитазу, усваивать фитат-связанный фосфор оценивали по содержанию общего

фосфора в тканях растений. Показали, что модифицированные растения содержали столько же фосфора в тканях, как и при росте на среде с неорганическим фосфатом, тогда как в тканях растений дикого типа содержание фосфора понижалось при росте на среде с фитатом в качестве единственного источника фосфора (рисунок 11 А, Б). Таким образом, экспрессия бактериальной фитазы позволила растениям поддерживать необходимое количество фосфора в тканях и не оказывала негативного влияния.

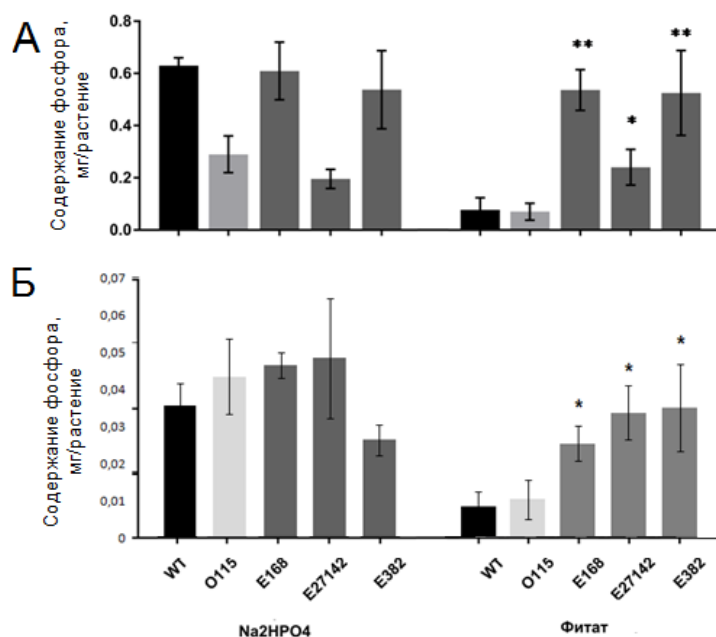


Рисунок 11. Содержание общего фосфора в тканях растений, экспрессирующих бактериальную фитазу при росте на средах с фитатом натрия или неорганическим фосфатом в качестве единственного источника фосфора. А. В побегах растений. Б. В корнях растений. Na₂HPO₄ – неорганический фосфат. WT – дикий тип растений, О-контрольная линия растений, Е- линии модифицированных растений.* P<0.05, ** P<0.01 (статистическая значимость).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование фитаз бактериального происхождения в решении проблемы дефицита фосфора является новым и перспективным методом в микробной биотехнологии. Нами впервые получены растения, экспрессирующие гистидиновую кислотную фитазу бактерий *P. agglomerans* под контролем сильного конститутивного вирусного промотора CaMV35S. Такие растения способны использовать фитат почв в качестве источника фосфора. Модификация микробной фитазы путем присоединения растительного сигнального пептида с N-конца позволила получить секретируемую фитазу, ассоциированную с клеточной стенкой, и обеспечить локализацию фитазы в окружающей среде для контакта с субстратом – фитатом. Интегрирование гена бактериальной фитазы проводили методом агробактериальной трансформации. В результате отбора трансформантов на селективной среде получили 3 независимые линии растений, гомозиготных по гену бактериальной фитазы. Экспрессия фитазы подтверждена нами на уровнях

транскрипции и трансляции. Модифицированные растения обладали высокой фитазной активностью при росте на средах с фитатом и использовали его в качестве единственного источника фосфора. В результате сравнительного анализа роста растений, экспрессирующих фитазу, и растений дикого типа мы показали, что модифицированные растения обладали способностью расти и развиваться в условиях дефицита фосфора. Полученные в ходе работы данные являются основанием к дальнейшей разработке новых биотехнологий с использованием бактериальных фитаз для улучшения роста растений и в качестве кормовых добавок для животных.

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволяют сделать следующие заключения:

1. Разработана гетерологичная система экспрессии с оптимизированным и модифицированным геном гистидиновой кислотной бактериальной фитазы *P. agglomerans* под управлением конститутивного вирусного промотора.
2. Впервые получены 3 независимые линии растений *A. thaliana*, гомозиготные по вставке гена фитазы *P. agglomerans* на основе вирусного промотора и 2 контрольные линии трансгенных растений.
3. Экспрессия гена бактериальной фитазы установлена в растениях на уровне транскрипции и трансляции. Молекулярная масса рекомбинантной фитазы составила ~ 40 кДа во фракции белка, связанного с клеточной стенкой клеток и ~ 50 кДа – в растворимой фракции белка растений.
4. Активность рекомбинантной фитазы обнаружена в клеточной стенке и растворимой фракции белка клеток корней модифицированных растений при росте на средах с разными источниками фосфора, включая фитат.
5. Модифицированные растения, экспрессирующие бактериальную фитазу, способны расти и развиваться на среде с фитатом: сухая масса побегов растений увеличивалась в 5 раз, диаметр и общая площадь листьев – в 3 и 4 раза, соответственно. Соотношение сухой массы корней и побегов у модифицированных растений не изменялось, что указывало на отсутствие дефицита фосфора в клетках при росте на среде с фитатом. Экспрессия рекомбинантной фитазы не снижала жизнеспособность семян модифицированных растений.
6. Растения, экспрессирующие бактериальную фитазу, способны усваивать фосфор на среде с фитатом: содержание фосфора в тканях модифицированных растений увеличилось в 4 раза по сравнению с растениями дикого типа.

Список работ, опубликованных по теме диссертации
Статьи в научных журналах, включенных в перечень ВАК

1. Khabipova, N.N. Heterologous expression of *Pantoea agglomerans* phytase gene optimized for plant-host expression/ N.N. Khabipova, **L.R. Valeeva**, I.B. Chastukhina, M.R. Sharipova, E.V. Shakirov// International Journal of Advanced Biotechnology and Research. – 2016. – V.7 (2). – p.683-688. автора: 0.375 пл. (перечень ВАК; WoS, IF=2.41).
2. Балабан, Н.П. Структурные особенности и механизм катализа β -пропеллерных фитаз бацилл/ Н.П. Балабан, А.Д. Сулейманова, **Л.Р. Валеева**, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова// Биохимия. – 2016. - Т.81. № 8. - С.1011-1020. автора: 0.125 пл. (перечень ВАК; Chemical abstracts, Scopus, WoS).
3. Nigmatullina, L.R. The stimulatory effect of *Pantoea* sp. 3.5.1 on the seed germination, plant growth and development/ L.R. Nigmatulina, A.D. Suleimanova, I.B. Chastukhina, **L.R. Valeeva**, M.A. Startseva, and M.R. Sharipova// International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR). – V. 7. № 2. – 2016. – P.798 – 805. автора: 0.08 пл. (перечень ВАК; WoS, IF=2.41).
4. Chastukhina, I.B. Selection of efficient Taq DNA polymerase to optimize T-DNA genotyping method for rapid detection of mutant *Arabidopsis thaliana* plants/ I.B. Chastukhina, L.R. Nigmatullina, **L.R. Valeeva**, E.V. Shakirov// BioNano Science. – 2016. – V. 6. – P. 407 – 410. автора: 0.06 пл. (перечень ВАК; Scopus, IF=0.428).
5. **Valeeva, L.R.** Expression of *Pantoea agglomerans* phytase from a strong constitutive promoter in *Arabidopsis thaliana* plants/ L.R. Valeeva, Ch. Nyamsuren, D.S. Troshagina, M.R. Sharipova, E.V. Shakirov// Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – V.6 (4). – P. 99 – 104. автора: 0.4 пл. (перечень ВАК; Scopus, IF=0.35).
6. Nyamsuren, Ch. An improved gene expression system to generate transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring a *Bacillus ginsengihumi* phytase gene/ Ch. Nyamsuren, **L.R. Valeeva**, M.R. Sharipova, E.V. Shakirov// Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS). – 2015. – V.6(4). – P.18 – 23. автора: 0.1 пл. (перечень ВАК; Scopus, IF=0.35).
7. Suleimanova, A.D. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1/ A.D. Suleimanova, A. Beinhauer, **L.R. Valeeva**, I.B. Chastukhina, N.P. Balaban, E.V. Shakirov, R. Greiner, M.R. Sharipova// App. and Environmental Microbiology. – 2015. – V. 81 (19). – P. 6790 – 6799. автора 0.08 пл. (перечень ВАК; WoS, IF=3.823).

8. Нямсүрэн, Ч. Оптимизация метода определения фитазной активности в клеточных компартментах корней растения *Arabidopsis thaliana*/ Ч. Нямсүрэн, **Л.Р. Валеева**, Л.Р. Нигматуллина, И.Б. Частухина, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, Е.В. Шакиров// Вестник технологического университета. – 2015. – Т.18. №13. – Р. 226 – 229. автора: 0.04 пл. (перечень ВАК; Chemical abstracts, Scopus).
9. Balaban, N.P. Inositol phosphates and their biological effects/ N.P. Balaban, A.D. Suleimanova, **L.R. Valeeva**, I.B. Chastukhina, M.R. Sharipova// Biomedical and Pharmacology Journal. – 2014. - V. 7(2). – P.433-437. автора 0.09 пл. (перечень ВАК; Scopus, WoS, IF=1.68).
10. Шарипова, М.Р. Механизмы устойчивости растений к инфекциям/ М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, А.М. Марданова, Ч. Нямсүрэн, **Л.Р. Валеева** // Ученые записки Казанского университета. Сер. Естеств. науки. – 2013. – Т. 155(4). – С.28 – 58. автора: 0.4 пл. (перечень ВАК; WoS (ESCI)).
11. Balaban, N.P. The novel ADAMs-like microbial metalloendopeptidase/ N.P. Balaban, N.L. Rudakova, A.R. Sabirova, **L.R. Valeeva**, M.R. Sharipova// Bioorganic Chemistry. – 2012. – V.38. – P.383 – 391. автора: 0.01 пл. (перечень ВАК; Scopus, IF=0.66).

Тезисы докладов и статьи в сборниках материалов конференций

12. **Valeeva, L.R.** Expression of bacterial phytase in *Arabidopsis thaliana* plants/ L.R. Valeeva, Ch. Nyamsuren, E.V. Shakirov, M.R. Sharipova // 41-й Конгресс Федерации Европейских биохимических обществ (FEBS-2016), 3-8 сентября 2016 г, г. Кушадасы, Турция. Сборник материалов конференции FEBS Journal – 2016. – V. 280. – P. 342-343. автора: 0.01 пл. (перечень ВАК; Scopus, IF=4.237)
13. **Валеева, Л.Р.** Экспрессия бактериальной фитазы *Pantoea agglomerans* растениями *Arabidopsis thaliana*/ Л.Р. Валеева, Д.С. Трошагина, Ч. Нямсүрэн, М.Р. Шарипова, Е.В. Шакиров// Acta Naturae, Спецвыпуск «Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM». – 2016. – Т. 2. - С.216. (перечень ВАК; Scopus, WoS, IF=1.77).
14. Нигматуллина, Л.Р. Идентификация генов, влияющих на естественный полиморфизм в длине теломер/ Л.Р. Нигматуллина, И.Б. Частухина, **Л.Р. Валеева**, М.Р. Шарипова, Е.В. Шакиров// Acta Naturae, Спецвыпуск «Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM». – 2016. – Т. 1. - С.218. (перечень ВАК; Scopus, WoS, IF=1.77).
15. Сулейманова, А.Д. Получение рекомбинантного штамма *Escherichia coli* с гиперэкспрессией фитазы *Pantoeae sp. 3.5.1*/ А.Д. Сулейманова, **Л.Р. Валеева**, И.Б. Частухина, М.Р. Шарипова// Acta Naturae, Спецвыпуск

«Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM». – 2016. – Т. 2. – С.232-233. (перечень ВАК; Scopus, WoS, IF=1.77).

16. **Валеева, Л.Р.** Гетерологичная экспрессия бактериальной фитазы *Pantoeae agglomerans* как способ решения недостатка фосфора в питании растений/ **Л.Р. Валеева**, Д.С. Трошагина, Ч. Нямсурэн, Е.В. Шакиров// Сборник тезисов II Всероссийского научного форума «Наука будущего — наука молодых», «Агро-, био-, продовольственные технологии», Казань. – 2016 г. – с. 29-32.

17. Нямсурэн, Ч. Получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*, с бактериальным геном фитазы *Pantoeae agglomerans*/ Ч. Нямсурэн, **Л.Р. Валеева**, Д.С. Трошагина, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова// Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии: мат-лы Всерос. науч.- практ. конф. Иркутск: – 2015. – С. 40 – 44. Автора: 0.06 пл.

18. Хабилова, Н.Н. Создание экспрессионной системы синтетического гена фитазы *Pantoeae agglomerans*/ Н.Н. Хабилова, **Л.Р. Валеева**, Ч. Нямсурэн, Л.Р. Нигматуллина, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова// Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии: мат-лы Всерос. науч.- практ. конф. Иркутск: – 2015. – С. 78 – 81. Автора: 0.04 пл.

19. **Валеева, Л.Р.** Растения *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующие бактериальную фитазу *Pantoeae agglomerans*/ Л.Р. Валеева, Ч. Нямсурэн, М.Р. Шарипова, Е.В. Шакиров// Сборник тезисов I Международной конференции Биомедицина, материалы и технологии. Казань. – 2015. – с. 39.

20. **Валеева, Л.Р.** Растения – продуценты микробных фитаз: перспективный метод биотехнологии/ Л.Р. Валеева, Ч. Нямсурэн, Д.С. Трошагина, М.Р. Шарипова, Е.В. Шакиров// Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии: мат-лы Всерос. науч.- практ. конф. Иркутск: – 2015. – С. 297 – 303. Автора: 0.09 пл.

21. **Валеева, Л.Р.** Экспрессия гена микробных фитаз в корнях растений как решение проблемы недостатка фосфора в почвах/ **Л.Р. Валеева**, Ч. Нямсурэн, Л.Р. Нигматуллина, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова// Сборник Тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». Казань. – 2014. – С. 52.

22. Нямсурэн, Ч. Экспрессия бактериального гена фитазы *Bacillus ginsengihumi* в модельном растении *Arabidopsis thaliana*/ Ч. Нямсурэн, **Л.Р. Валеева**, Л.Р. Нигматуллина, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова// Сборник трудов международной научно-практической конференции «Постгеномные

методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», Казань. – 2014. – С. 32.

23. Трошагина, Д.С. Фитаза *Pantoea agglomerans*: экспрессия в *Arabidopsis thaliana* под контролем вирусного промотора/ Д.С. Трошагина, **Л.Р. Валеева**, Ч. Нямсүрэн// Сборник Тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». Казань. – 2014. – С. 65.

24. **Валеева, Л.Р.** *Arabidopsis thaliana* с интегрированным геном фитазы *Bacillus ginsengihumi*/ Л.Р. Валеева, Ч. Нямсүрэн, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова// Сборник тезисов 18-я Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино. – 2014. – С. 13 – 14.

25. **Валеева Л.Р.** Получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*, несущих ген внеклеточной фитазы *bgPhyC* из почвенной бактерии *Bacillus ginsengihum*/ **Л.Р. Валеева**, Ч. Нямсүрэн// Тезисы докладов XX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых: «Ломоносов», Москва. – 2013. – С. 81-82.

26. **Валеева, Л.Р.** Получение растений *Arabidopsis thaliana* с интегрированным геном микробной фитазы/ **Л.Р. Валеева**, Ч. Нямсүрэн, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова// Сборник тезисов X Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и Биотехнология». Казань. – 2013. – С. 207-208.

27. Nyamsuren, Ch. Development of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a root-specific phytase of microbial origin/ Ch. Nyamsuren, **L.R. Valeeva**, A.I. Ahmetova, A.D. Suleimanova, N.P. Balaban, E.V. Shakirov, M.R. Sharipova// 38-й Конгресс Федерации Европейских биохимических обществ (FEBS-2013), 6-11 июля 2013 г, г. Санкт-Петербург. Сборник материалов конференции FEBS Journal – 2013. – V. 280. - Suppl.1. - P. 602. автора: 0.01 пл. (перечень ВАК; Scopus, IF=3.986).

28. Нямсүрэн, Ч. Получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* с интегрированным геном бациллярной фитазы/ Ч. Нямсүрэн, **Л.Р. Валеева**, А.И. Ахметова, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова// Сборник статей X Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». Казань. – 2013. – С. 88 – 93. Автора: 0.06 пл.

29. Нямсүрэн, Ч. Получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*, секретирующих микробную фитазу *bgPhyC* *Bacillus ginsengihumi*/ Ч. Нямсүрэн, **Л.Р. Валеева**, А.И. Ахметова, А.Д. Сулейманова, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова// XIII молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», РАСН,

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии. Москва. – 2013. – С. 39-40.

30. Нямсурэн, Ч. Гетерологичная система экспрессии генов на основе гена фитазы бацилл/ Ч. Нямсурэн, **Л.Р. Валеева**, А.И. Ахметова, А.Д. Сулейманова, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова// Тезисы докладов 17-я Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино. – 2013. – С.358-359.

31. Нямсурэн, Ч. Гетерологичная система экспрессии генов в растениях на основе гена бациллярной фитазы/ Ч. Нямсурэн, **Л.Р. Валеева**, А.И. Ахметова, А.Д. Сулейманова, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова// Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений», Москва. – 2013. – С. 212-213.

32. **Валеева, Л.Р.** Получение адамализиноподобной металлоэндопептидазы MprVp из рекомбинантного штамма *B. subtilis*/ Л.Р. Валеева// Материалы XIX Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Москва. - 2012. – с. 167 – 168.

33. **Валеева, Л.Р.** Новая адамализиноподобная металлопротеиназа *Bacillus pumilus*/ Л.Р. Валеева// Сборник тезисов конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине»: Казань. – 2012. – с. 363 – 365.

34. **Валеева, Л.Р.** Новая бактериальная адамализиноподобная металлоэндопептидаза *Bacillus pumilus*/ Л.Р. Валеева// Материалы V Всероссийского с международным участием медико-биологического конгресса молодых ученых. Тверь. – 2012. – с. 140 – 142.

35. Ширшикова, Т.В. Биоинформационный анализ в геномах энтеробактерий генов эффлюкс-системы/ Т.В. Ширшикова, **Л.Р. Валеева**, А.Г. Гиляева, Л.М. Богомольная, М.Р. Шарипова, А.М. Марданова, Ю.Д. Романова// Материалы V Всероссийского с международным участием медико-биологического конгресса молодых ученых. Тверь. – 2012. – с. 278 – 280.

Учебно-методическое пособие

36. Шакиров, Е.В. Учебно-методическое руководство по трансформации растений / Е.В. Шакиров, Ч. Нямсурэн, **Л.Р. Валеева**, М.Р. Шарипова; КФУ.- Казань: КФУ, 2013. – 18 с. автора: 0.3 пл.

Е-mail автора: lia2107@yandex.ru

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул.Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. Е-mail: ziabramova@mail.ru.